

THESIS

MUNICH

1966

VERSUCHE ZUM
IMMUNOLOGISCHEN NACHWEIS
VON BAKTERIENSUBSTANZEN
IN PASTEURISIERTER MILCH

Gertrud Richter

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

VERSUCHE ZUM IMMUNOLOGISCHEN NACHWEIS VON BAKTERIEN-
SUBSTANZEN IN PASTEURISIERTER MILCH

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gertrud Richter
aus
Warnsdorf / Böhmen

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Referent : Professor Dr. K. Stuhlfauth
Korreferent: Professor Dr. W. Seitz
Dekan : Professor Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 10. 66

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	4
II. Ausgangsmaterialien	
1. Antigene	5
2. Untersuchte Milchproben und deren Aufbereitung	6
3. Gewinnung der Immunseren	7
III. Angewandte Untersuchungsmethoden	
1. Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony ..	9
2. Bakterienagglutinationstest nach Widal ..	10
3. Elektrophorese im Agargel auf Objekt- trägern nach dem Prinzip von Grabar und Burtin	10
IV. Ergebnisse	
A. Versuche zur Prüfung des Antikörperge- haltes der Immunseren	11
B. Untersuchungen des Antigengehaltes der Milch bzw. der Molke	13
a. Versuche mit den Immunseren gegen L. bifidum und acidophilum	13
b. Versuche mit Antisubtilis serum	20
c. Versuche mit Anticereus serum	30
V. Diskussion	40
VI. Zusammenfassung	45
VII. Literaturverzeichnis	47

I. EINLEITUNG

Durch das Einwirken von sehr hohen Temperaturen auf die Keimflora der Milch enthält pasteurisierte Milch keine lebenden, Gefahr bringenden Bakterien mehr, aber noch Bakteriensubstanzen. Diese bakteriellen Substanzen könnten unter Umständen bei sehr empfindlichen Säuglingen und Kleinkindern, vielleicht auf allergischer Basis, zu Unverträglichkeitserscheinungen im Sinne von gastro-enteralen Störungen führen.

Eine Methode zum färberischen Nachweis solcher bakterieller Substanzen in sterilisierter Milch wurde in einer Arbeit von HOBBIER (1) gezeigt. Dabei wurde die von MOATS (2) angegebene Perjodsäure-Bisulfit-Toluidinblau-Färbung in Verbindung mit der mikroskopischen Keimzählung nach Breed zur Feststellung hitzegeschädigter Bakterien angewandt. Mit dieser Methode läßt sich ein hoher Prozentsatz (ca. 60%) der in der Ausgangsmilch vorhandenen Bakterien auch nach Einwirken von Temperaturen über 120°C nachweisen. Die anfärbbaren Keime lassen sich vor allem in grampositive Kokken, Streptokokken und Stäbchen differenzieren, aber auch gramnegative Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe werden bis zu einem gewissen Grade angefärbt.

Bei unseren Untersuchungen sollte nun der Nachweis von bakteriellen Substanzen in pasteurisierter Milch auf immunologischem Wege - mit Hilfe von Kaninchenimmunseren gegen abgetötete Milchbakterien - erbracht werden. Weiter sollte bestimmt werden, welche Grade der bakteriellen Verunreinigung der Milch mit den entsprechenden Immunseren noch erfaßt werden können. Als Antigene sollten von den vielen in der Milch vorkommenden Bakterien *Lactobacterium bifidum* und *acidophilum* (*L. bifidum* und *acido-*

philum) und *Bacillus subtilis* und *cereus* (*B. subtilis* und *cereus*) mit dem Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony und dem Bakterienagglutinationstest nach Widal nachgewiesen werden.

Dieser ursprüngliche Plan konnte jedoch nicht verwirklicht werden, da der Keim- bzw. Antigengehalt der pasteurisierten Milch offenbar zu gering war, um ihn mit den genannten Methoden nachzuweisen. Dagegen konnte mit Milchen, die Bakterienzusätze bekannter Konzentration enthielt, der zum immunologischen Nachweis erforderliche Bakteriengehalt in einer bestimmten Milchmenge verhältnismäßig annähernd ermittelt werden.

II. AUSGANGSMATERIALIEN

1. ANTIGENE *)

Als Antigene wurden Suspensionen folgender Bakterien verwendet:

- a. *L. bifidum* und *acidophilum* in einer Konzentration von etwa 6 Mill. Keimen/ml,
- b. *B. subtilis* in einer Konzentration von etwa 500 Mill. Keimen/ml,
- c. *B. cereus* in einer Konzentration von etwa 500 Mill. Keimen/ml.

Die Kulturen von *B. subtilis* wurden gesondert aufberei-

*) Für die Herstellung der einzelnen Bakterien suspensionen danken wir Herrn Dr. Köhler von der Allgäuer Alpenmilch A.G. München

tet: 20 ml Suspension lebender *B. subtilis* (500 Mill. Keime/ml) wurden während 30 Minuten bei 1,5 atü = 120°C autoclaviert, anschließend 30 Minuten bei 15000 UpM zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde in 10 ml einer 8-fach konzentrierten Molke gelöst und 20 Minuten mit Ultraschall (Ultraschallgerät der Fa. Schoeller) behandelt.

2. UNTERSUCHTE MILCHPROBEN UND DEREN AUFBEREITUNG

Zur Untersuchung diente pasteurisierte Milch (Tetrapackung, Hersteller Milchhof München GmbH) bzw. die nach dem Verfahren von DE MURALT (3,4,5) daraus gewonnene und konzentrierte Molke. Dazu wurde die Milch durch Zentrifugieren bei 3000 U/min während 15 Minuten vom Fettüberschuß befreit, mit n/10 HCl auf pH 4,6 angesäuert und anschließend für 2 Stunden bei 37°C und 12 weitere Stunden bei +4°C inkubiert. Die Molke wurde nach dem Abzentrifugieren des feinflockig ausgefallenen Caseins 12 Stunden gegen fließendes Leitungswasser und 18 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert, danach mit Carbowax 20000 (Serva) eingeengt (zwischen 5- und 33-fach) und schließlich erneut gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Die einzelnen Präparationen entsprachen einer 5- bis 33-fachen Konzentrierung gegenüber der Vollmilch und enthielten 2-5 g% Eiweiß.

Zum Teil wurde die konzentrierte Molke für Einzelversuche weiter behandelt. Dazu wurde eine konzentrierte Molke mit einem Eiweißgehalt von 3 g% durch 50 %iges Ammonium-Sulfat gefällt und durch Zentrifugieren bei 3000 U/min während 15 Minuten in einen Überstand und Niederschlag getrennt. Das in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommene Sediment wurde nach erneuter Präzipitation mit 70 %iger Essigsäure bei starker Sättigung und so die zuerst gewonnene Überstandsflüssigkeit während

jeweils 12 Stunden gegen Aqua dest. und physiologische Kochsalzlösung sulfatfrei dialysiert. Diese beiden Fraktionen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung auf das Ausgangsvolumen der Molke verdünnt und anschließend mit dem Rotationsverdampfer 10- und 50-fach eingengt. Bei 10-facher Konzentrierung betrug der Eiweißgehalt des gelösten Niederschlags 0,47 g%, der Überstandsflüssigkeit 2,32 g%, bei 50-facher Konzentrierung jeweils 2,376 g% und 11,96 g%.

3. GEWINNUNG DER IMMUNSEREN

Je drei Kaninchen wurden mit abgetöterten Bakterien immunisiert. Zur Immunisierung wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

- a. Eine Suspension von *L. bifidum* und *acidophilum* in einer Konzentration von etwa 6 Mill. Keimen/ml.

Die Immunisierung umfaßte 3 Zyklen: Der 1. Antigenstoß erfolgte während 3 Wochen, pro Woche 4 Injektionen der unbehandelten Bakteriensuspension mit steigenden Dosen, Anfangsdosis 0,5 ccm, Enddosis 2,5 ccm, Gesamtdosis 20 ccm je Tier. Die 3 Kaninchen wurden nach verschiedenen Methoden behandelt und zwar wurde Kaninchen I im Wechsel i.m. und i.V., Kaninchen II s.c. und i.V. und Kaninchen III nur i.V. gespritzt. Im Anschluß an diesen ersten Immunisierungszyklus erfolgte nach 8 Tagen Pause der 2. Antigenstoß mit aluminiumadsorbierten Bakterien. Dazu wurde die Bakteriensuspension mit einer 1 %igen Aluminiumsalzlösung im Verhältnis 10:1 versetzt und anschließend mit 1/10 n NaOH neutralisiert. Mit dieser Bakteriensuspension wurde Kaninchen I nur i.m., Kaninchen II und III nur i.V. während 4 Wochen gespritzt. Die einzelnen Dosen entsprachen denen der ersten Immunisie-

rung, nur die Gesamtdosis betrug 30 ccm. Nach einer erneuten Pause von 8 Tagen erfolgte der 3. Antigenstoß in Form eines kompletten Freund'schen Adjuvans mit 8 Injektionen zu je 2,5 ccm s.c. in 2 Wochen.

- b. Eine Suspension von *B. subtilis* in einer Konzentration von etwa 500 Mill. Keimen/ml.

3 Kaninchen wurden nach dem unter Punkt 2 a angegebenen Dosierungsschema in 2 Wochen mit der unbehandelten Bakteriensuspension, 2 weitere Wochen mit aluminiumadsorbierten Bakterien immunisiert (Herstellung unter Punkt 2 a beschrieben). Dabei wurde Kaninchen IV und V nur i.V., Kaninchen VI nur i.m. gespritzt. Nach 8 Tagen Pause wurde in einem weiteren Immunisierungszyklus Kaninchen VI nur i.V. 4 weitere Wochen mit aluminiumadsorbierten Keimen immunisiert.

- c. Eine Suspension von *B. cereus* in einer Konzentration von etwa 500 Mill. Keimen/ml.

Kaninchen VII, VIII und IX wurden während 4 Wochen nur i.V. mit aluminiumadsorbierten Bakterien immunisiert (Dosierungsschema und Herstellung unter Punkt 2 a angegeben).

Die Immunseren wurden einzeln als Seren nativ oder mit Carbowax 20000 (Serva) 5-fach konzentriert verwendet, es wurden keine Mischseren hergestellt.

III. ANGEWANDTE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

1. AGARGELDIFFUSIONSTEST NACH OUCHTERLONY (6,7)

Für die Herstellung der Agarplatten wurde ein im Handel erhältlicher Reinagar der Behringwerke benützt. Die Agarkonzentration betrug 0,8 %, als Puffer wurde ein 0,15 M Phosphatpuffer pH 7,1 verwendet. Durchmesser und Abstand der gestanzten Löcher betrug je 8 mm, die Füllmenge war jeweils 0,15 ml. Die Inkubation der Platten erfolgte bei Zimmertemperatur in der feuchten Kammer während einer Zeit von wenigstens 48 Stunden bis längstens 6 Tagen. In einzelnen Fällen wurden die Löcher nach 24 und 48 Stunden Diffusion erneut aufgefüllt.

Zur Entfernung des Eiweißüberschusses wurden die Präparate von den Platten gelöst und während mindestens 48 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Nach Aufziehen der Präparate auf Glasplatten wurden sie mit feuchtem Filterpapier bedeckt und bei 37°-40°C getrocknet. Anschließend wurden die Platten mit Amidoschwarz während etwa 20 Minuten gefärbt.

Farblösung:

Amidoschwarz 10 B	1,0 g
Acetatpuffer	850,0 ml
Glycerin	150,0 ml

Acetatpuffer:

500 ml Essigsäure (60 ml ad 1000,0 ml Aqua dest.)
+500 ml Na-Acetat (13,6 g Na-Acetat, 3 H₂O ad 1000,0 ml
Aqua dest.)

Als Entfärberlösung wurde eine 2 %ige Essigsäure verwendet.

2. BAKTERIENAGGLUTINATIONSTEST NACH WIDAL

Das zu testende Serum wurde in Mengen von 0,5 ml pro Röhrchen mit den gleichen Mengen Antigen versetzt. Die Inkubation erfolgte während 2 Stunden bei 52°C und während 15 bis 18 Stunden bei + 4°C im Kühlschrank.

3. ELEKTROPHORESE IM AGARGEL AUF OBJEKTTRÄGERN NACH DEM PRINZIP VON GRABAR UND BURTIN (8)

Die Agarkonzentration des verwendeten Difconobel-Agars betrug 1,8 %. Als Puffer wurde 0,05 M Veronalpuffer pH 8,2 benützt. Das Trennvolumen betrug 0,1 ml, die Trennungszeit bei Zimmertemperatur 1 Stunde. Als Spannung wurden bei einer Objektträgerlänge von 7,5 cm 40 V angelegt. Die Trocknung der Präparate erfolgte unter feuchtem Filterpapier bei 37°C. Zur Färbung wurde Amidoschwarz verwendet.

Farblösung:

Amidoschwarz	1,0 g
Essigsäure 1 M	450,0 ml
Na-Acetat 0,1 M	450,0 ml
Glycerin	100,0 ml

Als Entfärberlösung wurde eine 2 %ige Essigsäure mit 10 % Glycerin verwendet.

IV. ERGEBNISSE

A. VERSUCHE ZUR PRÜFUNG DES ANTIKÖRPERGEHALTES DER IMMUNSEREN

Zeitpunkt	Kaninchen	Widal-Test	Ouchterlony
4 Tage n.	I i.m./i.V.	1:100	
1. Imm.-	II s.c./i.V.	1:100	
Zyklus *)	III i.V.	1:200	
4 Tage n.	I i.m.	1:20	
2. Imm.-	II i.V.	1:40	
Zyklus *)	III i.V.	1:80	
5 Tage n.	I s.c.	1:40	1:1
3. Imm.-	II s.c.	1:40	1:8
Zyklus *)	III s.c.	1:40	1:8

Tab. 1 Antiseren gegen *L. bifidum* und *acidophilum*

*) Immunisierungszyklus s.S. 7

Die erste Kontrolle der Immunsereen im Bakterienagglutinationstest nach Widal ergab nur einen unzufriedigenden Antikörpergehalt. Deshalb wurde mit einem 2. Antigenstoß die Immunisierung fortgesetzt. Bei der zweiten Kontrolle stiegen die Titerergebnisse jedoch nicht an, sondern fielen ab. Dadurch wurde ein 3. Antigenstoß notwendig. Da jedoch der Antikörpergehalt der Immunsereen auch nach dem 3. Immunisierungszyklus nicht anzuheben war, wurden die Sereen für den Agardiffusionstest nach Ouchterlony be-

fach angereichert verwendet. Damit konnte der Antikörpergehalt der konzentrierten Seren II und III bis zu einer Verdünnung von 1:8 nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Untersuchungen nur mit den Seren II und III durchgeführt.

Zeitpunkt	Kaninchen	Widal-Test	Ouchterlony
4 Tage n.	IV i.V.	1:5120	1:6
1. Imm.-	V i.V.	1:5120	1:4
Zyklus *)	VI i.m.	1: 320	∅
6 Tage n.			
2. Imm.-			
Zyklus *)	VI i.V.	1:1280	∅

Tab. 2 Antiseren gegen *B. subtilis*
 *) Immunisierungszyklus s.S.8

Wie Tab. 2 zeigt, erwies sich die intravenöse Injektion bei Kaninchen IV und V als die wirksamste Form der Immunisierung. Kaninchen VI war während der ersten Phase der Immunisierung nur i.m. gespritzt worden. Die Testseren für die Antikörperkontrolle im Agargelulldiffusionstest nach Ouchterlony waren 5-fach konzentriert. Die Werte von Serum VI im Bakterienagglutinationstest und Agargelldiffusionstest erforderten eine weitere Immunisierung von Kaninchen VI. Nach dem 2. Antigenstoß stiegen zwar die Titerwerte im Bakterienagglutinationstest, im Agargelldiffusionstest jedoch konnte auch in dem 5-fach konzentrierten Serum VI kein Antikörpergehalt nachgewiesen werden. Deswegen wurden für die folgenden Untersuchungen nur die Seren IV und V verwendet.

Zeitpunkt	Kaninchen	Widal-Test	Ouchterlony
6 Tage n.	VII i.V.	1:5120	1:1
Immunisie-	VIII i.V.	1:1280	Ø
rungszyk.*)	IX i.V.	1: 320	Ø

Tab. 3 Antiseren gegen *B. cereus*

*) Immunisierungszyklus s.S.8

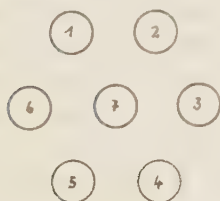
Mit den 5-fach konzentrierten Immunseren konnten im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony keine Immunpräzipitate nachgewiesen werden. Deswegen wurden alle weiteren Untersuchungen im Bakterienagglutinationstest nach Widal durchgeführt. Auf Grund des hohen Titerwertes wurde nur Serum VII verwendet.

B. UNTERSUCHUNGEN DES ANTIGENGESHALTES DER MILCH bzw. DER MOLKE

a. VERSUCHE MIT DEN IMMUNSEREN GEGEN *L. BIFIDUM* UND *ACIDOPHILUM*

Im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony sollte versucht werden die durch die Pasteurisierung abgetöteten Laktobakterien als Antigene in der Molke mit Hilfe der Immunseren nachzuweisen. Dazu wurde konzentrierte Molke in einer Verdünnungsreihe gegen die Immunseren angesetzt. Die Diffusionszeit betrug 4 Tage.

Versuch 1



- 1 = Molke 30-fach eingeeengt
- 2 = Molke 15-fach eingeeengt
- 3 = Molke 10-fach eingeeengt
- 4 = Molke 8-fach eingeeengt
- 5 = Molke 5-fach eingeeengt
- 6 = Molke 4-fach eingeeengt
- 7 = Antiserum 5-fach eingeeengt

In diesen Versuchen, die mit verschiedenen konzentrierten Molken (Konzentrierungen zwischen 5- und 33-fach) wiederholt wurden, traten keine Präzipitationen zwischen der Molke als Antigenträger und den Immunsereen auf. *L. bifidum* und *acidophilum* konnten also nicht als Antigene in der Molke pasteurisierter Milch nachgewiesen werden.

Bei der Überprüfung der Molkeherstellung entstand die Frage, ob durch die Ansäuerung der Milch zur Eiweißausfällung die Bakterien-substanzen mitausgefällt werden. Deswegen wurde Milch mit Laktobakterien experimentell verunreinigt und wie pasteurisierte Milch behandelt. Die aus dieser bakteriell verunreinigten Milch gewonnene Molke sollte auf ihren Bakteriengehalt untersucht werden. Damit waren die vermuteten Ausgangsbedingungen geschaffen und ein Modellversuch gestartet, um unsere Form der Milchaufbereitung zu kontrollieren.

Dazu wurden 500 ml pasteurisierter Milch 0,5 ml Bakteriensuspension lebender *L. bifidum* und *acidophilum* in einer Konzentration von etwa 6 Mill. Keimen/ml zugesetzt. Die aus dieser Milch gewonnene Molke wurde teils unbehandelt als Molke nativ, teils 18-fach konzentriert verwendet. In Versuch 2 wurde der Bakteriengehalt der beiden Molkepräparate getestet. Dazu wurden die 18-fach eingeengte Molke in einer Verdünnungsreihe und die Molke nativ als Antigene gegen die Immunsereen angesetzt. Die Diffusionszeit betrug 48 Stunden.

Versuch 2

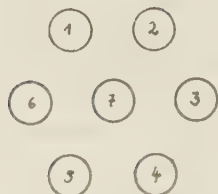


- 1 = Molke + Bakt. 18-fach einge.
- 2 = Molke + Bakt. 9-fach einge.
- 3 = Molke + Bakt. 6-fach einge.
- 4 = Molke + Bakt. 3-fach einge.
- 5 = Molke + Bakt. 3-fach einge.
- 6 = Molke + Bakt. nativ
- 7 = Antiserum 5-fach eingeengt

In diesem Versuch traten Präzipitationslinien einerseits zwischen der 18-fach konzentrierten Molke (1) und der Molke nativ (6), andererseits zwischen dem Antiserum (7) und der Molke nativ (6) auf. Dieser Befund konnte in mehreren Kontrolldiffusionstesten, auch mit neu angefertigten Molkepräparaten, wiederholt bestätigt werden. Allerdings erwiesen sich diese Präzipitationen, vor allem zwischen den beiden Molkeprodukten als äußerst instabil, da sie zum Teil beim Waschen der Platten in physiologischer Kochsalzlösung wieder verschwanden. Zwischen der Verdünnungsreihe der konzentrierten Molke und dem Immunserum traten keine Immunpräzipitate auf. Damit konnten also in der konzentrierten Molke des Modellversuches *L. bifidum* und *acidophilum* nicht als Antigene nachgewiesen werden.

Die Präzipitationslinien in Versuch 2 entstanden zwischen zwei Molken, die sich nur durch eine verschiedene Antigenkonzentration unterschieden. Es ergab sich daher die Frage, ob eventuell in der konzentrierten Molke eine größere Antikörperkonzentration gegenüber einer kleineren Antigenkonzentration und in der Molke nativ ein größerer Antigengehalt gegenüber einem kleineren Antikörpergehalt besteht. Deshalb wurde in Versuch 3 eine konzentrierte Molke auf einen eventuellen Antikörpergehalt gegen *L. bifidum* und *acidophilum* geprüft. Dazu wurde eine 8-fach konzentrierte bakterienfreie Molke gegen die Laktobakterien in einer absteigenden Verdünnungsreihe (von 6 Mill. bis zu 500000 Keimen/ml) getestet. Die Platte wurde nach 24 und 48 Stunden Diffusion erneut aufgefüllt, die gesamte Inkubationszeit betrug 6 Tage.

Versuch 3

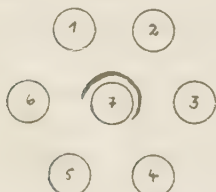


- 1 = L. 6 Mill. Keime/ml
- 2 = L. 3 Mill. Keime/ml
- 3 = L. 2 Mill. Keime/ml
- 4 = L. 1,5 Mill. Keime/ml
- 5 = L. 1 Mill. Keime/ml
- 6 = L. 500000 Keime/ml
- 7 = 8-fach konzentrierte Molke

In diesem Versuch konnten keine Immunpräzipitate zwischen der konzentrierten Molke und der Bakterienverdünnungsreihe nachgewiesen werden. Damit wurde also ein vermuteter Antikörpergehalt gegen *L. bifidum* und *acidophilum* in der konzentrierten Molke nicht bestätigt.

Die im Versuch 2 auch noch aufgetretene Präzipitation zwischen der Molke nativ und dem Antiserum zeigte, daß in der Molke nativ *L. bifidum* und *acidophilum* als Antigene nachgewiesen werden können. In Versuch 4 sollte nun geklärt werden, bis zu welcher Verdünnung der Molke nativ der Antigengehalt an *L. bifidum* und *acidophilum* erfaßt werden kann. Dazu wurde das Molkepräparat in einer Verdünnungsreihe gegen das Antiserum angesetzt. Die Diffusion betrug 48 Stunden.

Versuch 4



- 1 = Molke + Bakt. nativ 1:1
- 2 = Molke + Bakt. nativ 1:2 verd.
- 3 = Molke + Bakt. nativ 1:3 verd.
- 4 = Molke + Bakt. nativ 1:4 verd.
- 5 = Molke + Bakt. nativ 1:6 verd.
- 6 = Molke + Bakt. nativ 1:8 verd.
- 7 = Antiserum 5-fach eingengt

In diesem Test konnte der Antigengehalt an *L. bifidum* und *acidophilum* in der Molke nativ durch eine Präzipi-

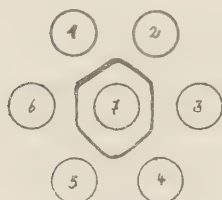
tationslinie bis zu einer Molkeverdünnung von 1:3 nachgewiesen werden.

Damit konnte gleichzeitig das System der Milchaufbereitung erfolgreich kontrolliert werden. Die Immunpräzipitate zwischen dem Antiserum und dem aus einer experimentell mit Laktobakterien verunreinigten Milch gewonnenen Molkepräparat beweisen nämlich, daß durch die Ansäuerung der Milch der größte Teil der bakteriellen Substanzen nicht mitausgefällt wird. Auch werden die Bakterien-substanzen durch die Art der Milchaufbereitung in ihrer Antigenität nicht beeinflusst und können somit in der Molke mit Hilfe der Immunseren als Antigene immunologisch erfaßt werden.

Das bedeutet also, daß bei der gewählten Molkegewinnung und Versuchsanordnung schätzungsweise ein Keimgehalt von etwa 2000 Bakterien/ml der Milch erforderlich ist, um ihn immunologisch nachzuweisen. (Berechnung: 500 ml Milch enthielten etwa 3 Mill. Keime, 1 ml etwa 6000 Keime. Der Nachweis der Keime erfolgte bis zu einer Molkeverdünnung von 1:3, was einem Keimgehalt von etwa 2000 *L. bifidum* und *acidophilum*/ml der Milch entspricht.)

Durch die beiden Modellversuche (Versuch 2 und 4) entstand die Frage, ob die Antiseren für die Untersuchungen eventuell eine zu geringe Antikörperkonzentration enthalten oder ob die Anwesenheit der Molke die Antigenität der Bakterien hemmt. Zur Klärung dieser Frage wurde in Versuch 5 das Immunserum gegen eine Verdünnungsreihe lebender Keime getestet. Die Diffusionszeit betrug 48 Stunden.

Versuch 5



- 1 = L. 6 Mill. Keime/ml
- 2 = L. 3 Mill. Keime/ml
- 3 = L. 2 Mill. Keime/ml
- 4 = L. 1,5 Mill. Keime/ml
- 5 = L. 1 Mill. Keime/ml
- 6 = L. 500000 Keime/ml
- 7 = Immuns serum 5-fach eingeengt

In diesem Ansatz zeigten sich Immunpräzipitate zwischen dem Immuns serum und der gesamten Bakterienverdünnungsreihe. Der Antikörpergehalt der Antiseren kann deshalb für die Untersuchungen in den Modellversuchen als ausreichend angenommen werden.

Zur weiteren Kontrolle der Immuns eren wurde in Versuch 6 ein Serum eines unbehandelten Kaninchens (Blutabnahme erfolgte vor Beginn der Immunisierung) als Vergleichsserum gegen die Molkepräparate der Modellversuche angesetzt. Die Diffusionszeit betrug 48 Stunden.

Versuch 6



- 1 = Kaninchennormalserum nativ
- 2 = Immuns erum II nativ
- 3 = Physiologische Kochsalzlösg.
- 4 = Immuns erum III nativ
- 5 = Kaninchennormalserum nativ
- 6 = Molke + Bakterien nativ
- 7 = Molke + Bakt. 18-fach einge.

In diesem Versuch traten Präzipitationslinien zwischen dem Serum eines unbehandelten Kaninchens und der Molke nativ auf. Dieses Ergebnis konnte in mehreren Kontrolldiffusionstesten, auch mit anderen Seren von unbehandelten Kaninchen, wiederholt bestätigt werden. Diese Linien erwiesen sich zum Teil allerdings als äußerst

instabil, da sie sich beim Waschen der Platten in physiologischer Kochsalzlösung wieder lösten. Deswegen liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei überhaupt nur um unspezifische Komplexe gehandelt hat. Andererseits könnten diese Linien auch mit einem bereits bestehenden Antikörpergehalt der Seren von unbehandelten Kaninchen erklärt werden, da diese Tiere im Laufe ihrer Lebens ja auch reichlich mit den getesteten Keimen in Berührung kommen und somit von sich aus schon Antikörper entwickelt haben können. Die Linien traten nämlich zwischen dem Serum und einer antigenhaltigen Molke auf. Zur Prüfung dieser Frage wurde ein Serum eines unbehandelten Kaninchens mit der konzentrierten Bakteriensuspension auf einen eventuellen Antikörpergehalt gegen *L. bifidum* und *acidophilum* untersucht. Gleichzeitig wurde eine bakterienfreie 6-fach konzentrierte Molke und eine bakteriell verunreinigte 18-fach konzentrierte Molke angesetzt. Die Diffusionszeit betrug 48 Stunden.

Versuch 7



- 1 = *L. 6* Mill. Keime/ml
- 2 = Molke bakteriell verunreinigt 18-fach eingeeengt
- 3 = Kaninchennormalserum nativ
- 4 = bakterienfreie Molke 6-fach eingeeengt

Das Ergebnis dieses Versuches zeigte eine Präzipitationslinie zwischen der konzentrierten bakterienhaltigen Molke und dem Serum eines unbehandelten Kaninchens. Zwischen der Bakteriensuspension und dem Serum entstand jedoch keine Linie. Damit konnte in dem Serum eines unbehandelten Kaninchens kein Antikörpergehalt gegen *L. bifidum* und *acidophilum* nachgewiesen werden.

Die zwischen dem Serum eines unbehandelten Kaninchens

und der bakteriell verunreinigten Molke aufgetretene Präzipitation, die im Versuch 6 ausgeblieben war, könnte durch eine eventuelle Einwirkung der Molke auf die Bakterien im Sinne einer Änderung ihrer Antigenität bewirkt werden. Allerdings zeigte diese Linie beim Waschen auch eine mehr oder minder große Tendenz zur Auflösung, so daß man nicht von einer echten Präzipitation im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion sprechen kann. Die Molke allein kann diesen Effekt jedoch nicht bewirken, da die zum Vergleich angesetzte bakterienfreie Molke mit dem Serum kein Präzipitat bildete.

b. VERSUCHE MIT ANTISUBTILISERUM

Mit Hilfe der Immunseren sollte im Agargelddiffusionstest nach Ouchterlony in der Molke pasteurisierter Milch *B. subtilis* als Antigen nachgewiesen werden. Dazu wurde eine 6-fach konzentrierte Molke in einer Verdünnungsreihe gegen das Antisubtilisserum angesetzt. Die Diffusionszeit betrug 6 Tage.

Versuch 8

		1 = Molke 6-fach eingeeengt	
①	②	2 = Molke 4-fach eingeeengt	
		3 = Molke 3-fach eingeeengt	
⑥	⑦	③	4 = Molke 2-fach eingeeengt
			5 = Molke nicht eingeeengt
⑤	④		6 = Normalserum nativ
			7 = Immunserum 5-fach eingeeengt

Dieser Versuch, der in derselben Anordnung mit verschiedenen eingeeengten Molken (Konzentrierungen zwischen 6- und 20-fach) wiederholt wurde, zeigte keine Immunpräzi-

pitate. Leibessubstanzen von *B. subtilis* konnten also mit dieser Methode nicht als Antigene in der Molke pasteurisierter Milch nachgewiesen werden.

Bei der Prüfung des Antikörpergehaltes der Antisubtilisieren im Agargelddiffusionstest (Tab. 2) war bereits aufgefallen, daß sich die Immunpräzipitate nur zögernd bildeten. Es wurde daher angenommen, daß die Antigene in ihrer Größenordnung für die Diffusion im Agargel zu grob seien. Deshalb wurde *B. subtilis* für den folgenden Modellversuch in einem Molkebakteriengemisch mit Ultraschall behandelt und zerkleinert. (Methoden und Material unter Punkt II/1 beschrieben). Dieses Molkebakteriengemisch im Verhältnis 1:2 wurde in einer geometrischen Verdünnungsreihe gegen das Antisubtilisserum als Antigen verwendet. Die Diffusionszeit betrug 48 Stunden.

Versuch 9



- 1 = Molkebakteriengemisch 1:1
- 2 = Molkebakteriengemisch 1:4
- 3 = Molkebakteriengemisch 1:8
- 4 = Molkebakteriengemisch 1:16
- 5 = Molkebakteriengemisch 1:32
- 6 = bakterienfreie Molke 8-fach
eingeengt
- 7 = Immunsrum 5-fach eingeengt

In diesem Test entstanden Präzipitationslinien zwischen dem Antiserum und dem Molkebakteriengemisch bis zu einer Verdünnung von 1:4. In weiteren Versuchen konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden, da sich nur unspezifische, in physiologischer Kochsalzlösung lösliche Komplexe bildeten.

Da in Versuch 9 die Immunpräzipitate nur bei hohem Antigengehalt auftraten, ergab sich die Frage, ob *B. sub-*

tilis durch die Ultraschallbehandlung einen Teil seiner Antigeneigenschaft verloren hat. Für diese Untersuchung wurde der Versuch 9 mit abgetöteten unbehandelten Bakterien wiederholt. Analog zu dem Modellversuch wurde ein Molkebakteriengemisch aus 8-fach konzentrierter Molke und der Suspension abgetöteter unbehandelter Keime (500 Mill./ml) im Verhältnis 1:2 hergestellt und als Antigen in einer geometrischen Verdünnungsreihe gegen das Immunserum angesetzt. Die Diffusionsdauer betrug 48 Stunden.

Versuch 10



- 1 = Molkebakteriengemisch 1:1
- 2 = Molkebakteriengemisch 1:4
- 3 = Molkebakteriengemisch 1:8
- 4 = Molkebakteriengemisch 1:16
- 5 = Molkebakteriengemisch 1:32
- 6 = bakterienfreie Molke 8-fach
eingengt
- 7 = Immunserum 5-fach eingengt

Dieser Test zeigte eine Präzipitationslinie zwischen dem Antiserum und dem Molkebakteriengemisch bis zu einer Verdünnung von 1:4. Dieses Ergebnis entsprach dem Resultat von Versuch 9. Damit konnte bewiesen werden, daß *B. subtilis* in seiner Antigenwirkung durch die Ultraschallbehandlung nicht beeinflusst wurde und daß die Größenstruktur der Antigene die Reaktion im Agarsystem nicht hemmt.

Beide Versuche zeigen außerdem, daß bei den gewählten Versuchsanordnungen schätzungsweise ein Keimgehalt von etwa 250 Mill. *B. subtilis*/ml der Milch erforderlich ist, um ihn immunologisch nachzuweisen. (Da in Versuch 4 gezeigt werden konnte, daß der größte Teil der Bakterienbestandteile auch nach der Milchaufbereitung noch

in der Molke enthalten ist, wurde für die folgende Berechnung von vornherein nur die Molke experimentell mit *B. subtilis* verunreinigt. Berechnung: Das Molkebakteriengemisch bestand aus einem Teil Molke und zwei Teilen Bakterien. Das bedeutet, daß 1 ml Molke etwa 1 Milliarde Keime enthielt. Ihr Nachweis gelang bis zu einer Verdünnung des Molkebakteriengemisches von 1:4, was einem Keimgehalt von etwa 250 Mill./ml der Molke entspricht).

Mit den identischen Ergebnissen von Versuch 9 und 10 blieb die Frage unbeantwortet, weshalb die Antigen-Antikörper-Reaktion nur bei hohem Bakteriengehalt auftrat. Es wurde daher die Möglichkeit erwogen, ob eventuell die Anwesenheit der Molke die Reaktion hemmen kann. Für diese Untersuchung wurde in den folgenden Versuchen in dem Molkebakteriengemisch sowohl der Anteil an *B. subtilis* als auch der Gehalt an konzentrierter Molke variiert.

Versuch 11 diente einer Kontrolle der Bakterien. Dazu wurde die Bakteriensuspension abgetöteter Keime vom Ausgangsvolumen in einer Verdünnungsreihe zusammen mit einer konstanten Menge einer physiologischen Kochsalzlösung im Verhältnis 2:1 als Antigen gegen das Immunserum angesetzt. Die Diffusionszeit betrug 3 Tage.

Versuch 11

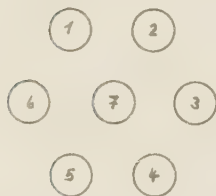


- 1 = *B. 500* Mill. Keime/ml + NaCl (2:1)
- 2 = *B. 250* Mill. Keime/ml + NaCl (2:1)
- 3 = *B. 125* Mill. Keime/ml + NaCl (2:1)
- 4 = *B. 60* Mill. Keime/ml + NaCl (2:1)
- 5 = *B. 30* Mill. Keime/ml + NaCl (2:1)
- 6 = Normalserum nativ
- 7 = Immunserum nativ

In diesem Test konnten auch nach 3 Tagen Diffusionsdauer keine Immunpräzipitate nachgewiesen werden.

In Versuch 12 wurde daher ein Molkebakteriengemisch aus konstanter Bakterienmenge und einer Molkeverdünnungsreihe gegen das Immunserum angesetzt. Im einzelnen bestand das Molkebakteriengemisch aus einer geometrischen Verdünnungsreihe einer 8-fach eingeeengten Molke versetzt mit einer gleichbleibenden Bakterienmenge (500 Mill. Keime/ml) im Verhältnis 1:2. Die Diffusionsdauer betrug 3 Tage.

Versuch 12



- 1 = Molke 1:8 + B. 500 Mill.
Keime/ml (1:2)
- 2 = Molke 1:6 + B. konz. (1:2)
- 3 = Molke 1:4 + B. konz. (1:2)
- 4 = Molke 1:2 + B. konz. (1:2)
- 5 = Molke 1:1 + B. konz. (1:2)
- 6 = bakterienfreie Molke 6-fach
eingeeengt
- 7 = Immunserum nativ

Auch in diesem Versuch konnten keine Präzipitationslinien nachgewiesen werden.

Für Versuch 13 wurde als Antigen ein Molkebakteriengemisch aus einer Bakterienverdünnungsreihe zusammen mit einer konstanten Menge einer 8-fach konzentrierten Molke im Verhältnis 2:1 hergestellt. Die Diffusionsdauer betrug ebenfalls 3 Tage.

Versuch 13



- 1 = B. 500 Mill. Keime/ml +
Molke 1:8 (2:1)
- 2 = B. 250 Mill. Keime/ml +
Molke 1:8 (2:1)
- 3 = B. 125 Mill. Keime/ml +
Molke 1:8 (2:1)
- 4 = B. 60 Mill. Keime/ml +
Molke 1:8 (2:1)
- 5 = B. 30 Mill. Keime/ml +
Molke 1:8 (2:1)
- 6 = bakterienfreie Molke 6-fach
eingengt
- 7 = Immuns serum nativ

Auch in diesem Test konnten keine Immunpräzipitate nachgewiesen werden.

Die in dieser Versuchsreihe (Versuch 11, 12 und 13) aufgetretenen Linien waren teilweise identisch mit den Ergebnissen der Versuche 9 und 10. Sie hatten jedoch keine Beweiskraft, da sie als lösliche Komplexe beim Waschen wieder verschwanden.

Möglicherweise ist dies durch die lange Inkubationszeit von 3 Tagen bedingt, während nämlich die Platten von Versuch 9 und 10 nur 48 Stunden inkubiert waren.

Da auch die Antigenkontrolle in Versuch 11 negativ verlief, konnte mit den Versuchen 12 und 13 nichts darüber ausgesagt werden, ob die Molke die Antigen-Antikörper-Reaktion hemmen kann.

Mit diesen Versuchen im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony konnten somit keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Deshalb wurden noch weitere Untersuchungen im Bakterienagglutinationstest nach Widal durchgeführt.

Mit diesem Test sollte ebenfalls die Frage geklärt werden, ob die Molke die Antigen-Antikörper-Reaktion hemmt. Dazu wurde in Versuch 14 zu einer Verdünnungsreihe des Antisubtilisserums ein Molkebakteriengemisch als Antigen gegeben. Es bestand aus einer konstanten Menge von 500 Mill. Keimen/ml (konz.) zusammen mit einer Verdünnungsreihe einer primär 6-fach konzentrierten Molke im Verhältnis 2:1.

Versuch 14

Antisubtilisserum							
Antigen	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	Ag.-K.
1	+	+	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-

Tab. 4 Versuch zur Klärung der hemmenden Wirkung der Molke auf die Agglutination

Antigene: 1 = B. konz. + NaCl-Puffer im Verhältnis 2:1
 2 = B. konz. + Molke 1:6 im Verhältnis 2:1
 3 = B. konz. + Molke 1:3 im Verhältnis 2:1
 4 = B. konz. + Molke 1:1 im Verhältnis 2:1

Wie die Titerergebnisse zeigen, konnte in diesem Versuch eine gewisse hemmende Wirkung der Molke auf die Agglutination festgestellt werden. Die einzelnen Titer werden bei konstantem Anteil an Bakterien in dem Molkebakteriengemisch von der Konzentration des Molkebestand-

teils bestimmt; d.h. bei fallender Konzentration der Molke steigt der Titer an und ist ohne Molke am höchsten. Das bedeutet, daß die Molke eine Hemmwirkung auf die Agglutination ausübt.

Um die Frage abzuklären, welche Stoffe der Molke die Agglutinationshemmung bewirken, wurden in Versuch 15 die unter Punkt II/2 beschriebenen Molkefraktionen, Sediment wie Supernatant in der 10-fach angereicherten Form verwendet. Die beiden Präparate wurden im Verhältnis 1:2 mit der konzentrierten Bakteriensuspension versetzt und als Antigen zu der Verdünnungsreihe des Immunserums gefüllt.

Versuch 15

Antisubtilis serum							
Antigen	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	Ag.-K.
1	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-

Tab. 5 Versuch zur Klärung, welche Stoffe in der Molke eine Agglutinationshemmung bewirken

Antigene: 1 = B. konz. + NaCl-Puffer im Verhältnis 2:1
2 = B. konz. + gelöstes Sediment (10-fach
eingeengt) im Verhältnis 2:1
3 = B. konz. + Supernatant (10-fach eingeengt) im Verhältnis 2:1

Die Titerergebnisse dieses Versuches zeigen, daß beide Molkefraktionen die Bakterienagglutination in gleicher Weise hemmen. Damit besteht kein Anhalt dafür, daß die im Sediment enthaltenen Gamma-Globuline wirksam in die Antigen-Antikörper-Reaktion eingreifen.

Die Auftrennung der Molke in einen Überstand und Niederschlag und der damit durchgeführte Versuch 15 sollten nämlich die Frage klären, ob die in der Molke vorhandenen Immunglobuline (Immunlactoglobuline) als Agglutinationshemmer angenommen werden können. Da der Versuch 15 aber eine Agglutinationshemmung durch beide Molkefraktionen zeigte, wurde zur weiteren Untersuchung eine Analyse der Proteine der Molke und ihrer Fraktionen mit der Elektrophorese im Agargel auf Objektträgern versucht. Der Proteingehalt der dazu verwendeten Molke betrug 3 g%, des Sedimentes nach Wiederauflösung mit physiologischer Kochsalzlösung 0,47 g%, des Überstandes 2,96 g%.

In mehreren Arbeiten (9,11,12,13) wurde eine Analyse der Kuhmilchproteine versucht. Damit konnte gezeigt werden, daß nach Ausfällung der verschiedenen Caseinfraktionen aus der Milch in der Molke auf Grund ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit folgende Proteine unterschieden werden können: Alpha-Lactalbumin, β -Lactoglobulin und Gamma-Immunglobuline (Immunlactoglobuline (14,15)); außerdem enthält die Molke eine Serumalbuminfraktion und "Red Milk Protein" (10).

Wanderungsbereiche der Serumeiweißkörper:



Abb. 1 Elektrophorese einer Molke mit einem Proteingehalt von 3 g%

Abb. 2 Elektrophorese eines Sedimentes mit einem Proteingehalt von 0,47 g%

Abb. 3 Elektrophorese eines Überstandes mit einem Proteingehalt von 2,96 g%

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Elektrophorese der Molke (Abb. 1) zur Fraktionierung ihrer einzelnen Bestandteile brachte die Gamma-Globuline nicht zur Darstellung. Auch die elektrophoretische Auftrennung des Sedimentes (Abb. 2) erlaubte keine Rückschlüsse auf das Gamma-Globulinsystem der Molke.

Da mit diesem Verfahren Gamma-Globuline nicht dargestellt werden konnten, muß ihre Konzentration in pasteurisierter Milch als außerordentlich gering angesehen werden.

Eine Arbeit von ROULET, BEIN und VON MURALT (11) konnte zudem zeigen, daß die Immunglobuline der Kuhmilch schon nach sehr schonender thermischer Behandlung immunologisch nicht mehr nachgewiesen werden können.

Mit all dem konnte die Vermutung, daß die Immunglobuline der Molke als Agglutinationshemmer wirken, nicht bestätigt, aber auch nicht sicher abgelehnt werden. Auch blieb die Frage offen, welche Bestandteile der Molke die Agglutination mit *B. subtilis* hemmen.

c. VERSUCHE MIT ANTICEREUSSERUM

Bei der Prüfung des Antikörpergehaltes der Anticereusseren konnten im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony (Tab. 3) keine Immunpräzipitate nachgewiesen werden. Deshalb wurden die folgenden Untersuchungen mit dem Bakterienagglutinationstest nach Widal durchgeführt. Als Immuns serum wurde nur Serum VII, nicht angereichert, verwendet.

Mit diesem Test sollte in der Molke aus pasteurisierter Milch *B. cereus* als Antigen durch sein Antiserum nachgewiesen werden. Dazu wurde in Versuch 16 Molke in verschiedener Konzentration als Antigenträger zu einer Serumverdünnungsreihe gefüllt.

Versuch 16

Anticereusserum				
Antigen	1:10	1:20	1:40	Ag.-K.
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-

Tab. 6 Versuch zum Nachweis von *B. cereus* als Antigen in konzentrierter Molke

Antigene: 1 = Molke 3-fach eingeeengt
2 = Molke 6-fach eingeeengt
3 = Molke 12-fach eingeeengt

In diesem Versuch trat zwischen dem Antiserum und den verschieden konzentrierten Molken keine Agglutination auf. Damit konnte *B. cereus* also nicht als Antigen in der Molke pasteurisierter Milch nachgewiesen werden.

Zur weiteren Klärung des Antigennachweises von *B. cereus* in der Molke wurde ein Modellversuch angesetzt. Dabei wurde die Molke experimentell mit Bakterien verunreinigt. Diese Molke sollte in Versuch 17 auf ihren Antigengehalt geprüft werden. Im einzelnen bestand das Antigen aus konzentrierter Molke in einer Verdünnungsreihe und einer konstanten Menge abgetöteter Bakterien (500 Mill. Keime/ml) im Verhältnis 1:2.

Versuch 17

Anticereusserum							
Antigen 1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	Ag.-K.	
1	++	++	+	-	-	-	-
2	++	++	++	++	++	-	-
3	++	++	++	++	+	-	-
4	++	++	++	-	-	-	-

Tab. 7 Modellversuch zum Antigennachweis von
B. cereus in der Molke

Antigene: 1 = *B. konz.* + NaCl-Puffer im Verhältnis 2:1
 2 = *B. konz.* + Molke 1:6 im Verhältnis 2:1
 3 = *B. konz.* + Molke 1:3 im Verhältnis 2:1
 4 = *B. konz.* + Molke 1:1 im Verhältnis 2:1

Wie Tab. 7 zeigt, konnte in den verschiedenen konzentrierten und bakteriell beschickten Molken *B. cereus* als Antigen nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde mit diesem Versuch festgestellt, daß hier die Molke eine Agglutinationsförderung bewirkt, kenntlich am Titerabfall analog der Molkeverdünnung. Bei fallender Konzentration der Molke sinkt der Titer und ist ohne Molke am niedrigsten. Auf Grund dieses Effektes kann der Grad der Verunreinigung der Milch bzw. Molke mit *B. cereus*, der mit dem Immunserum noch erfaßt werden könnte, nicht bestimmt werden.

Um festzustellen, ob die Agglutinationsförderung in einer zeitlichen Abhängigkeit vom Molkezusatz steht, wurden *B. cereus* und Molke nicht in einem Gemisch, sondern zeitlich getrennt einer Serumverdünnungsreihe zugesetzt.

Versuch 18

Anticereusserum

Antigen 1:640 1:1280 1:2560 1:5120 1:10240 1:20480 Ag.-K.

+ 0,35 ml *B. cereus* (500 Mill. Keime/ml)
1 Stunde Wasserbad bei 37°C

1	++	+	-	-	-	-	-
2	++	++	++	++	++	-	-
3	++	++	++	++	++	-	-

Tab. 8 Versuch zur Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Molkewirkung auf die Bakterienagglutination

Antigene: 1 = 0,15 ml NaCl-Puffer
2 = 0,15 ml Molke 1:6
3 = 0,15 ml Molke 1:2

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß bei nachträglichem Zusatz von konzentrierter Molke die Agglutinationswerte noch gestiegen sind.

Wie weit dieser Effekt von der Bakterienkonzentration abhängig ist, sollte Versuch 19 zeigen. Für diese Untersuchung wurde als Antigen ein Molkebakteriengemisch aus *B. cereus* in einer geometrischen Verdünnungsreihe und einer konstanten Menge 4-fach konzentrierter Molke hergestellt. Die einzelnen Gemische wurden dem 320-fach verdünnten Antiserum zugesetzt.

Agargel auf Objektträgern versucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob in dem gelösten Sediment Immunglobuline vorhanden sind und damit eventuell für die Agglutinationsförderung verantwortlich gemacht werden können. Dazu wurde ein gelöstes Sediment mit einem Eiweißgehalt von 0,2 g% elektrophoretisch in seine Proteinbestandteile aufgetrennt.

Wanderungsbereich der Serumeiweißkörper:

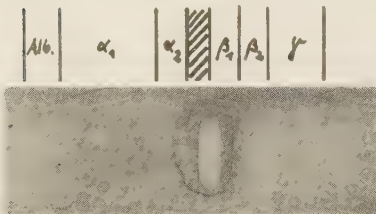


Abb. 4 Elektrophorese eines gelösten Sedimentes mit einem Eiweißgehalt von 0,2 g%

Wie Abb. 4 zeigt, ergab diese Elektrophorese keinen Anhalt dafür, daß in dem gelösten Sediment noch Immunglobuline vorhanden sind. Damit konnte auch die Vermutung, daß eventuell die Immunglobuline der Milch die Agglutinationsförderung mit *B. cereus* bewirken, nicht bestätigt werden.

Mit dieser Untersuchung konnten also die Stoffe der Molke mit einer agglutinationsfördernden Wirkung nicht ermittelt werden. Es entstand daher die Frage, ob eventuell der hohe Proteingehalt der Molkefraktionen, unabhängig von einem spezifisch immunologischen Eingriff, für eine Agglutination mit den Bakterien verantwortlich ist. Für diese Untersuchung wurden gelöstes Sediment und Supernatant in der 50-fach eingeeengten Form mit einem Proteingehalt von 2,47 g% und 11,96 g% mit dem Antigen

(etwa 200 Mill. *B. cereus*/ml) auf ihre Agglutinationswirkung geprüft.

Versuch 21

	Sediment	Supernatant	
	50-fach eingengt	50-fach eingengt	Ag.-K.
Antigen	+	+	+

Tab. 11 Versuch zur Untersuchung der Beeinflussung durch den hohen Proteingehalt der Molkefraktionen auf die Agglutination mit *B. cereus*

Antigen: *B. cereus* in einer Konzentration von etwa 200 Mill. Keimen/ml

In diesem Test traten schwache Agglutinationen sowohl zwischen dem Sediment und Supernatant und dem Antigen, als auch in der Antigen-Kontrolle auf. Die Ursache für diese Reaktion in der Antigen-Kontrolle dürfte in diesem Fall an den Bakterien liegen, die bei zunehmender Alterung häufig Spontanagglutinationen zeigen. Auf Grund dieses Befundes wurde der Versuch nicht zur Auswertung herangezogen.

Um aber die positiven Titerergebnisse zwischen den beiden Molkefraktionen und dem Antigen doch näher zu untersuchen, wurden die beiden Molkepräparate auf einen eventuellen Antikörpergehalt gegen *B. cereus* geprüft. Dazu wurden im Agargelddiffusionstest nach Ouchterlony gelöstes Sediment und Supernatant in der 50-fach angereicherten Form mit der Bakteriensuspension getestet. Die Diffusionszeit betrug 4 Tage.

Versuch 22



- 1 = gelöstes Sediment 50-fach
eingeengt
- 2 = Supernatant 50-fach einge-
engt
- 3 = Anticereusserum nativ
- 4 = *B. cereus* 500 Mill. Keime/ml

In diesem Ansatz konnten keine Immunpräzipitate nachgewiesen werden. Damit konnten auch keine Antikörper gegen *B. cereus* in den beiden Molkefraktionen festgestellt werden.

Mit diesen Untersuchungen konnte also die Frage nicht geklärt werden, welche Bestandteile der Molke bzw. des Sedimentes die Agglutination mit *B. cereus* fördern können.

Durch die Versuche mit *B. subtilis* und *B. cereus* in Molkebakteriengemischen konnten zwei verschiedene Wirkungsweisen der Molke auf die Agglutination nachgewiesen werden. Es zeigte sich nämlich, daß die Molke die Agglutination mit *B. subtilis* hemmt und mit *B. cereus* fördert. Ungeklärt blieb allerdings die Frage, auf welche Faktoren der Antigen-Antikörper-Reaktion die Molke in der beschriebenen Weise einwirkt.

Zu dieser Untersuchung wurde eine Kreuzreaktion durchgeführt, dergestalt, daß zu dem Anticereusserum als Antigen *B. subtilis*, bzw. ein Molkebakteriengemisch mit diesen Keimen gegeben wurde und zu dem Antisubtilisserum *B. cereus* bzw. ein Molkebakteriengemisch mit *B. cereus*.

Versuch 23

Anticereusserum								
Antigen 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280 Ag.-K.								
1	+	+	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-
Antisubtilisserum								
3	+	+	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-	-

Tab. 12 Untersuchung der Wirkung der Molke auf die Agglutination in einem Kreuz-Test

Antigene: 1 = *B. subtilis* 200 Mill. Keime/ml + NaCl-Puffer im Verhältnis 2:1
 2 = *B. subtilis* 200 Mill. Keime/ml + Molke 4-fach eingeengt im Verhältnis 2:1
 3 = *B. cereus* 200 Mill. Keime/ml + NaCl-Puffer im Verhältnis 2:1
 4 = *B. cereus* 200 Mill. Keime/ml + Molke 4-fach eingeengt im Verhältnis 2:1

Dieser Test zeigte deutlich den spezifischen Einfluß der Molke auf *B. subtilis* im Sinne einer Agglutinationshemmung und auf *B. cereus* im Sinne einer Agglutinationsförderung. Die Antigene mit Molkezusatz wiesen mit den heterologen Antikörpern nämlich denselben Agglutinationseffekt auf wie mit den analogen Immunseren. Damit konnte nachgewiesen werden, daß die Molke speziell die Antigene, jedoch nicht die Anti-

körper beeinflusst. Die Molke scheint also die Antigenität der grampositiven Stäbchen dahingehend zu verändern, daß in der Antigen-Antikörper-Reaktion mit *B. subtilis* eine Agglutinationshemmung und mit *B. cereus* eine Agglutinationsförderung auftritt.

V. DISKUSSION

Wenn auch durch den Prozeß der Pasteurisierung die meisten Keime der Milch abgetötet und zerstört werden, so sind doch mit Sicherheit noch Bakterienleibessubstanzen in der pasteurisierten Milch enthalten. Es muß allerdings angenommen werden, daß die Konzentration dieser bakteriellen Substanzen nur äußerst gering ist, wodurch ihr immunologischer Nachweis sehr erschwert wird.

In dieser Arbeit wurde der immunologische Nachweis von vier in der Milch vorkommenden Bakterien versucht, nämlich von *Lactobacterium bifidum* und *acidophilum* und *Bacillus subtilis* und *cereus*. Diese Keime sollten als Antigene mit Hilfe von Kaninchenimmunseren, die wir selbst herstellten, in der pasteurisierten Milch nachgewiesen werden.

Dazu muß aber festgehalten werden, daß es nicht gelang, Immunseren mit einem genügend hohen Antikörpergehalt zu erzielen (Tab. 1, 2, 3). Die Antiseren gegen *L. bifidum* und *acidophilum* zeigten besonders geringe Antikörpertiter. Die verminderte Antikörperbildung könnte damit erklärt werden, daß die Tiere entweder besonders tolerant gegen die Keime ihrer physiologischen Darmflora sind, oder daß die Laktobakterien keine wesentliche Antigenität besitzen.

Unter diesen Umständen erscheint es von vornherein sehr fraglich, ob mit diesen Immunseren die geringe Zahl der genannten Bakterien in der pasteurisierten Milch immunologisch erfaßt werden kann. Sicher ist dies nicht in normaler, sondern nur in bakteriell stark verunreinigter und eingeengter Milch möglich. Vollmilch läßt sich allerdings wegen des hohen Eiweißgehaltes für diese Methodik nicht verwenden. Deswegen wurden das Casein durch Säurefällung und aus der gewonnenen Molke der Milchzucker durch Dialyse entfernt (unter Punkt II/2 beschrieben). Dieses Molkepräparat konnte nun konzentriert werden. Bei der Molkeherstellung war dann allerdings noch abzuklären, in wie weit Bakterien, die auch nach der Pasteurisierung noch färberisch als leidlich intakte Keime nachweisbar sind, durch die Säurefällung der Milch mit entfernt werden. Für diese Untersuchung wurde ein Modellversuch (Versuch 4) angesetzt, wobei die Milch experimentell mit *L. bifidum* und *acidophilum* verunreinigt wurde. Dabei konnten auch nach der Milchaufbereitung in der Molke die genannten Keime als Antigene im Agargel-diffusionstest bis zu einer Verdünnung von 2000 Keimen/ml nachgewiesen werden. Dieser Versuch zeigt, daß ein großer Teil der Bakterien auch nach der Säurefällung noch in der Molke enthalten sein muß.

Trotz der Konzentrierung der Molke und der darin enthaltenen Bakterien-substanzen ist es in den Untersuchungen mit dem Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony und mit dem wesentlich empfindlicheren Bakterienagglutinationstest nach Widal nicht gelungen, bakterielle Substanzen von *L. bifidum* und *acidophilum* (Versuch 1), von *B. subtilis* (Versuch 8) und *B. cereus* (Versuch 16) als Antigene in pasteurisierter Milch mit Hilfe der Immunseren qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Es muß daher angenommen werden, daß auch bei Einengung der Molke für den immunologischen Nachweis in den Präparaten zu wenig

Bakteriensubstanzen vorhanden sind.

Deswegen wurde an Hand von Modellversuchen, in denen die Milch bzw. die Molke mit Bakterien experimentell verunreinigt wurde, der Antigennachweis der genannten Keime vorgenommen (Versuch 2, 4, 9, 10, 14, 17). Mit den Ergebnissen im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony konnten damit *L. bifidum* und *acidophilum* und *B. subtilis* als Antigene in der Molke nachgewiesen werden (Versuch 4 und 10). Da die Präparate Bakterienzusätze bekannter Konzentration enthielten, läßt sich die zum immunologischen Nachweis erforderliche Mindestzahl der Keime pro ml der Molke bzw. Milch errechnen. Damit konnte also festgestellt werden, daß bei den gewählten Versuchsbedingungen ein Keimgehalt von etwa 2000 *L. bifidum* und *acidophilum* pro ml und etwa 250 Mill. *B. subtilis* pro ml der Milch erforderlich ist, um ihn mit den entsprechenden Immunsereen noch zur Darstellung zu bringen. (Berechnung siehe S. 17 und S. 23). Die analogen Untersuchungen im Bakterienagglutinationstest nach Widal wurden dadurch erschwert, daß offenbar die Molke die Agglutination beeinflusst. Und zwar bewirkt die Molke bei der Reaktion mit *B. subtilis* eine Agglutinationshemmung (Versuch 14), mit *B. cereus* dagegen eine Agglutinationsförderung (Versuch 17 und 18). In beiden Fällen wurde eine Abhängigkeit der Agglutinationswerte vom Zusatz der Molke bzw. ihrer Konzentration festgestellt. Dabei stiegen die Agglutinationstiter in der Reaktion mit *B. subtilis* bei fallender, mit *B. cereus* dagegen bei steigender Molkekonzentration.

Zur Untersuchung, welche Bestandteile der Molke in der beschriebenen Weise in die Antigen-Antikörper-Reaktion eingreifen, wurde Molke durch 50%ige Ammonium-Sulfat-Fällung in einen Überstand und Niederschlag getrennt. Diese beiden Molkefraktionen wurden im Bakterienagglutinationstest nach Widal auf ihre agglutinationsbeeinflussende Wirkung untersucht. Dabei konnte festgestellt wer-

den, daß beide Fraktionen die Reaktion mit *B. subtilis* hemmen (Versuch 15), während die Agglutinationsförderung bei *B. cereus* nur durch das gelöste Sediment hervorgerufen werden kann (Versuch 20).

Die weiteren Untersuchungen sollten die Frage klären, welche Bestandteile der Molkefraktionen die Agglutination in der beschriebenen Weise beeinflussen können. Dazu wurde eine Analyse der Proteine sowohl des Überstandes wie Niederschlages mittels der Elektrophorese im Agargel auf Objektträgern versucht. Damit sollten eventuell vorhandene Immunglobuline der Milch ermittelt werden, die unter Umständen für die Molkewirkung verantwortlich sein könnten. Diese fraktionierte Auftrennung der Bestandteile der Molke und ihrer Fraktionen (Abb. 1, 2, 3, 4) ergab jedoch, daß die einzelnen Molkepräparate kaum noch Immunglobuline enthalten. Offenbar werden diese sehr empfindlichen Eiweiße schon vorher zerstört.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Molke nicht die Immunseren bzw. die Antikörper beeinflusst, sondern daß ihre agglutinationshemmende bzw. -fördernde Wirkung durch eine Änderung der Antigenstruktur von *B. subtilis* und *B. cereus* bedingt ist. In einem Kreuztest (Versuch 23) konnte nämlich die Abhängigkeit der Antigenwirkung der einzelnen Keime vom Molkezusatz bestätigt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben jedoch keinen Hinweis auf die Natur des agglutinationshemmenden bzw. -fördernden Stoffes in der Molke. Deshalb darf dieser Effekt auch nicht als eine spezifisch immunologische Einwirkung der Molke auf die Antigenstruktur der Keime erklärt werden. Es muß auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß es sich dabei um unspezifische Adsorptionseffekte, eventuell durch Milcheiweiße oder Polysaccharide, gehandelt haben könnte. Besonders zu berücksichtigen ist der hohe Eiweißgehalt der verschiedenen Molkepräparate, wodurch im Bakterienagglutinations-

test nach Widal auch eine unspezifische Agglutination entstehen könnte.

Außerdem muß daran gedacht werden, daß sich die bei Kaninchen schon natürlicherweise vorkommenden Antikörper auch gegen die genannten Keime auf Grund ihrer physiologischen Bedeutung richten und somit die Agglutinationsergebnisse beeinflussen könnten.

Dazu sei der Versuch 6 erwähnt, in dem ein Immunpräzipitat zwischen einem Serum eines unbehandelten Kaninchens und der mit *L. bifidum* und *acidophilum* verunreinigten Molke nachzuweisen war. Diese immunologische Reaktion könnte nur mit einem bereits bestehenden Antikörpergehalt gegen die Laktobakterien in dem Serum eines unbehandelten Kaninchens erklärt werden. Die Linien hatten allerdings keine volle Beweiskraft, da sie sich bei erneuten Versuchen zum Teil als in physiologischer Kochsalzlösung lösliche Komplexe erwiesen. Deshalb ist die Reaktion wohl unspezifisch.

Überhaupt wurde im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony häufig das Auftreten von Linien beobachtet, die beim Waschen der Präparate in physiologischer Kochsalzlösung wieder verschwanden. Diese scheinbaren Präzipitationen traten vor allem bei der Verwendung von Molkebakteriengemischen auf. Wenn auch ihre Entstehung ungeklärt erscheint, so konnte doch festgestellt werden, daß sie ganz besonders häufig bei sehr langer Diffusionsdauer auftraten. Man könnte daher annehmen, daß es sich hierbei um Produkte gehandelt hat, die durch die Diffusion beim Aufeinandertreffen der zu untersuchenden Substanzen im Sinne einer immunologisch unspezifischen Eiweißanreicherung entstanden sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Wenn auch durch die Pasteurisierung die meisten Keime der Milch abgetötet und zerstört werden, so sind doch mit Sicherheit noch deren Leibessubstanzen in der pasteurisierten Milch enthalten. In dieser Arbeit sollten solche bakteriellen Substanzen in der pasteurisierten Milch mit Hilfe von Immunseren erfaßt werden. Der Versuch des immunologischen Nachweises erstreckte sich auf folgende in der Milch vorkommenden Keime: *Lactobacterium bifidum* und *acidophilum* und *Bacillus subtilis* und *cereus*. Zu diesem Zwecke wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit den genannten abgetöteten Keimen Antiseren erzeugt. Da die Immunseren jedoch zum Teil einen geringen Antikörpergehalt aufwiesen und die Milch bzw. Molke auch nach Einengung zu wenig Bakteriensubstanzen enthielt, konnten im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony und im Bakterienagglutinationstest nach Widal die genannten Keime nicht als Antigene nachgewiesen werden. Dagegen konnte mit Milch, die Bakterienzusätze bekannter Konzentration enthielt, der zum immunologischen Nachweis erforderliche Keimgehalt in einer bestimmten Milchmenge teilweise annähernd ermittelt werden. So konnten mit den Ergebnissen im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony die Mindestzahl von etwa 2000 L. *bifidum* und *acidophilum* pro ml und etwa 250 Mill. B. *subtilis* pro ml der Milch für den immunologischen Nachweis mit den entsprechenden Immunseren bestimmt werden. Die analogen Untersuchungen im Bakterienagglutinationstest nach Widal wurden dadurch erschwert, daß die Molke die Reaktion mit B. *subtilis* im Sinne einer Agglutinationshemmung, mit B.

cereus im Sinne einer Agglutinationsförderung beeinflusst. Mit der Fraktionierung der Molke durch 50 %ige Ammonium-Sulfat-Fällung in einen Überstand und Niederschlag und den Untersuchungen mit diesen beiden Präparaten im Bakterienagglutinationstest konnte gezeigt werden, daß beide Fraktionen die Reaktion mit *B. subtilis* hemmen, während die Agglutinationsförderung in der Reaktion mit *B. cereus* nur durch den gelösten Niederschlag hervorgerufen wird. Welche Bestandteile der Molke in der beschriebenen Weise in die Bakterienagglutination eingreifen, konnte auch durch eine Analyse der Proteine der Molke bzw. ihrer Fraktionen mit der Elektrophorese im Agarigel auf Objektträgern noch nicht geklärt werden. In einem Kreuztest konnte jedoch gezeigt werden, daß die Molke nicht die Immunseren bzw. die Antikörper beeinflusst, sondern die Antigenstruktur der Keime dahingehend verändert, daß die Reaktion mit *B. subtilis* gehemmt, mit *B. cereus* dagegen gefördert wird.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. A. Hobbiger, Österreichische Milchwissenschaft 19, Beilage 9 (1964)
2. W. A. Moats, Journ. of Dairy Sci. 44, 1431 (1961)
3. E. Gugler, G. Bokelmann, A. Dättwyler u. G. von Muralt, Schw. med. Wschr. 88, 1264 (1958)
4. E. Gugler u. G. von Muralt, Schw. med. Wschr. 89, 925, (1959)
5. G. Schwick, H. O. Esser u. Fr. Koch, Behringwerk-Mitteilungen Heft 37, 11 (1959)
6. G. Schwick u. K. Störiko, Laboratoriumsblätter (Behringwerke) Mai 1964
7. Ö. Ouchterlony, Diffusion-in-gel methods for immunological analysis, Progr. Allergy 5, 1 (1958) und 6, 30 (1962)
8. P. Grabar und P. Burtin, Immunelektrophoretische Analyse, Elsevier Publishing Company 1964
9. E. Gugler, M. Bein u. G. von Muralt, Schw. med. Wschr. 89, 1172 (1959)
10. M. L. Groves, American Chemical Society Meeting, Boston, April 1959, S. 33 C.
11. D. L. A. Roulet, M. Bein u. G. von Muralt, Milchwissenschaft, 16, 415 (1961)
12. L. A. Hanson u. B. Johansson, Experientia 15, 377 (1959)
13. L. A. Hanson, Experientia 15, 471 (1959)
14. E. L. Smith, J. biol. Chem. 164, 145 (1946)
15. E. L. Smith, J. biol. Chem. 165, 665 (1946)

Herrn Professor Dr. K. Stuhlfauth danke ich für die Überlassung des Themas und die Hilfe bei der Ausführung der Arbeit.

Herrn Dr. G. Schierz (Max-von-Pettenkofer-Institut) bin ich für die wertvolle Unterstützung in theoretischen und praktischen Fragen und Fräulein H. Gaedicke (Medizinische Poliklinik der Universität) für die Einführung in die Versuchstechnik zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 7. August 1941 wurde ich als Tochter des Studienrates Dr. phil. Ernst Richter und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Burghardt, Studienrätin, in Warnsdorf/Böhmen geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich für ein Jahr das Realgymnasium der Englischen Fräulein in Augsburg und anschließend das Neue Gymnasium, Humanistische Abteilung, in Regensburg bis zum Abitur im Juli 1960.

1960 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München und legte im Winter-Semester 1962/63 das Physikum ab.

1963/64 studierte ich für zwei Semester an der Universität Wien und kehrte anschließend nach München zurück.

Am 1. August 1966 habe ich an der Universität München das Medizinische Staatsexamen bestanden.

Seit 5. Oktober 1966 arbeite ich als Medizinalassistentin an der II. Medizinischen Universitätsklinik.

